

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002年10月3日 (03.10.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/076935 A1(51) 国際特許分類: C07C 323/60, A61K 7/00, 7/42,
31/185, 31/195, 31/197, 31/198, A61P 17/16, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/02577

(22) 国際出願日: 2002年3月18日 (18.03.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

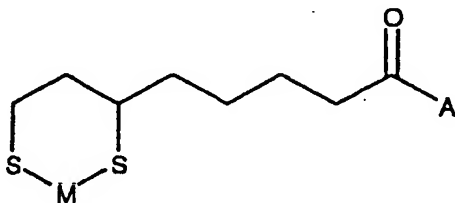
(30) 優先権データ:
特願2001-78571 2001年3月19日 (19.03.2001) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 千寿製
薬株式会社 (SENJU PHARMACEUTICAL CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒541-0046 大阪府 大阪市 中央区平野町2丁
目5番8号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 緒方 一美
(OGATA, Kazumi) [JP/JP]; 〒565-0085 大阪府 豊中市
上新田4丁目8番B-701 Osaka (JP). 阪上 享宏(SAKAUE, Takahiro) [JP/JP]; 〒664-0892 兵庫県 伊丹
市 高台5-1 Hyogo (JP). 伊藤 和彦 (ITO, Kazuhiko)
[JP/JP]; 〒673-0018 兵庫県 明石市 西明石北町1丁目
3-2 2-4 05 Hyogo (JP).(74) 代理人: 松田 玲子 (MATSUDA, Reiko); 〒541-0046 大
阪府 大阪市 中央区平野町2丁目5番8号 千寿製薬
株式会社 知的財産部 Osaka (JP).(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特
許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: NOVEL A-LIPOIC ACID DERIVATIVE AND USE THEREOF

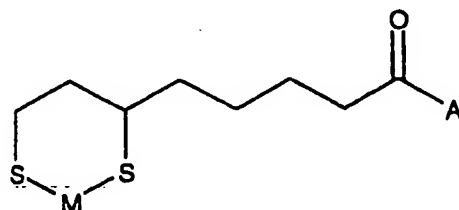
(54) 発明の名称: 新規 α -リポ酸誘導体およびその用途

(I)

(57) Abstract: A novel a-lipoic acid derivative
represented by the following formula (I). It has
tyrosinase inhibitory activity, melanin production
inhibitory activity, and elastase inhibitory activity. (I)
(In the formula, M represents a metal and A represents
an amino acid residue bonded through the nitrogen
atom.).

(57) 要約:

チロシナーゼ阻害作用、メラニン産生抑制作用およびエラスターゼ阻害作用

を有する、次の式 (I) で表される新規の α -リポ酸誘導体を提供する。

(I)

(式中、M は金属を示し、A は N 結合したアミノ酸残基を示す。)

BEST AVAILABLE COPY

WO 02/076935 A1

WO 02/076935 A1



添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

新規 α -リポ酸誘導体およびその用途

技術分野

- 5 本発明は、新規な α -リポ酸誘導体またはその薬理学的に許容できる塩およびその用途に関する。

背景技術

- 10 α -リポ酸（別名：チオクト酸または 6,8-ジチオオクタン酸）はミトコンドリアに存在する補酵素で、抗酸化能を有し、酸化ストレスによる種々の病態の治療、たとえば動脈硬化症および白内障の治療薬として注目されている。また、その還元型のジメルカプトオクタン酸は酸化型のグルタチオンやビタミン C などを還元再生させる作用がある。

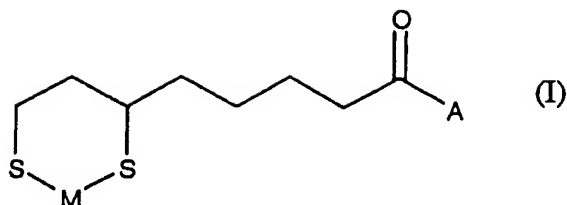
- 15 α -リポ酸誘導体として、 α -リポ酸にグリシン、メチオニン、グルタミン酸、バリンなどがそれぞれ結合した α -リポイルアミノ酸が知られている（特公昭 42-1286 号、対応米国特許 No. 3,238,224）。また、特開 2000-169371 号公報には α -リポイルアミノエチルスルホン酸のイミダゾール塩が記載され、グルタチオン還元酵素活性増強剤としての用途が記載されている。

- 20 上記のような状況下、本発明者らは種々検討を重ねた結果、新規の α -リポイルアミノ酸の還元体（ジハイドロ体）の金属キレート化合物およびそれらの薬理学的に許容される塩を効率的に合成することに成功し、これら化合物がチロシナーゼ阻害作用、メラニン産生抑制作用およびエラスターゼ阻害作用を有することを見出し、さらに研究を進めて本発明を完成させた。

- 25 発明の開示

すなわち、本発明は、

(1)次の式 (I)



- 5 (式中、Mは金属を示し、AはN結合したアミノ酸残基を示す。)で表されるN-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アミノ酸金属キレート化合物またはその薬理的に許容できる塩(以下、本化合物という。)
- (2)N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アミノ酸金属キレート化合物がN-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)- α -アミノ酸金属キレート、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)- β -アミノ酸金属キレート、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)- γ -アミノ酸金属キレート、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)- δ -アミノ酸金属キレートおよびN-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)- ϵ -アミノ酸金属キレートからなる群から選ばれるものである、上記(1)記載のN-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アミノ酸
- 15 金属キレート化合物またはその薬理的に許容できる塩、
- (3)N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アミノ酸金属キレート化合物がN-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アミノエタンスルホン酸金属キレート、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)グリシン金属キレート、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アスパラギン酸金属キレート、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)-6-アミノヘキサン酸金属キレート、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)- γ -アミノ-n-酪酸金属キレート、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)フェニルアラニン金属キレート、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アントラニル酸金属キレート、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)メチオニン金属キレートおよびN-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)システイン金属キレートからなる群から選ばれるものである、上記(1)記載のN-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アミノ酸金属
- 20 キレート化合物またはその薬理的に許容できる塩、
- (4)金属が亜鉛である上記(1)記載のN-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)
- 25

- アミノ酸金属キレート化合物またはその薬理学的に許容できる塩、
- (5) 上記(1)～(4) のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩を含有する医薬、
- (6) 上記(1)～(4) のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる
- 5 塩を含有するチロシナーゼ阻害剤、
- (7) 上記(1)～(4) のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩を含有するメラニン産生抑制剤、
- (8) 上記(1)～(4) のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩を含有する皮膚のしみ、そばかすまたは日焼けの予防・治療剤、
- 10 (9) 上記(1)～(4) のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩を含有する美白剤、
- (10) 上記(1)～(4) のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩を含有する美肌剤、
- (11) 上記(1)～(4) のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩を含有するエラスターゼ阻害剤、
- 15 (12) 上記(1)～(4) のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩を含有する抗シワ剤、
- (13) 上記(1)～(4) のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩を含有する化粧品、
- 20 (14) 上記(1)～(4) のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の有効量をヒトに投与することを含む、チロシナーゼを阻害する方法、
- (15) 上記(1)～(4) のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の有効量をヒトに投与することを含む、メラニン産生を抑制する方法、
- (16) 上記(1)～(4) のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる
- 25 塩の有効量をヒトに投与することを含む、皮膚のしみ、そばかすまたは日焼けの予防・治療方法、
- (17) 上記(1)～(4) のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の有効量をヒトに投与することを含む、皮膚の美白方法、

- (18)上記(1)～(4)のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の有効量をヒトに投与することを含む、皮膚の美肌方法、
- (19)上記(1)～(4)のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の有効量をヒトに投与することを含む、エラスターゼを阻害する方法、
- 5 (20)上記(1)～(4)のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の有効量をヒトに投与することを含む、シワの予防・治療方法、
- (21)医薬製造のための上記(1)～(4)のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の使用、
- (22)チロシナーゼ阻害剤の製造のための上記(1)～(4)のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の使用、
- 10 (23)メラニン産生抑制剤の製造のための上記(1)～(4)のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の使用、
- (24)皮膚のしみ、そばかすまたは日焼けの予防・治療剤の製造のための上記(1)～(4)のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の使用、
- 15 (25)美白剤の製造のための上記(1)～(4)のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の使用、
- (26)美肌剤の製造のための上記(1)～(4)のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の使用、
- (27)エラスターゼ阻害剤の製造のための上記(1)～(4)のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の使用、
- 20 (28)抗シワ剤の製造のための上記(1)～(4)のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の使用、および
- (29)化粧品製造のための上記(1)～(4)のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の使用に関する。
- 25 本化合物は α -リポ酸とアミノ酸がアミド結合し、さらに金属がキレート結合した構造を有し、文献未載の新規化合物である。本発明において、アミノ酸とは同一分子内にカルボキシル基とアミノ基を有する、いわゆる α -アミノ酸、 β -アミノ酸、 γ -アミノ酸、 δ -アミノ酸、 ε -アミノ酸、並びにアミノメ

チルシクロヘキサンカルボン酸およびアントラニル酸、並びに同一分子内にスルホン酸基とアミノ基を有するアミノエタンスルホン酸（タウリン）をいう。
 α -アミノ酸としては、たとえばグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、メチオニン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、アルギニン、リジン、ヒスチジン、フェニルアラニン、トリプトファンなどが挙げられ、 β -アミノ酸としては β -アラニンが挙げられ、 γ -アミノ酸としては γ -アミノ-n-酪酸（GABA）やカルニチンが挙げられ、 δ -アミノ酸としては5-アミノレブリン酸や5-アミノ吉草酸、 ϵ -アミノ酸としては6-アミノヘキサン酸が
10 挙げられる。これらアミノ酸のうち、アントラニル酸、アミノエタンスルホン酸、メチオニン、フェニルアラニン、 γ -アミノ-n-酪酸、6-アミノヘキサン酸が好ましい。

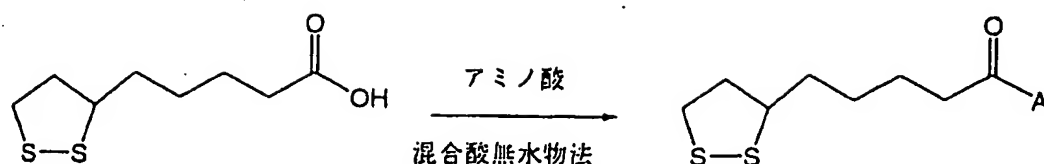
本願の金属キレート化合物の金属としては、2価の金属である亜鉛やコバルト、2価または3価の金属である鉄または4価のゲルマニウムを用いるのが好まし
15 い。このうち特に2価の金属である亜鉛が好ましい。本化合物は精製も簡単で安定な化合物である。

本化合物の薬理学的に許容できる塩としては、ナトリウム塩やカリウム塩などのアルカリ金属塩およびカルシウム塩やマグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩が挙げられるが、これら以外の塩であっても薬理学的に許容できる塩であ
20 りばいずれのものであっても本発明の目的のため適宜に用いることができる。

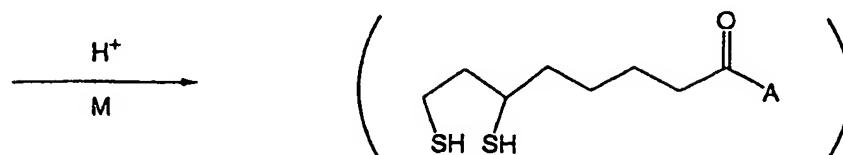
さらに、これらの1水和物、2水和物、1/2水和物、1/3水和物、1/4水和物、2/3水和物、3/2水和物、6/5水和物も本発明に含まれる。

中間体の α -リポイルアミノ酸の合成法としては、アミノ酸の酸性基のカルボン酸を保護基としてエステル化し、 α -リポ酸と脱水縮合剤で酸アミドとし、
25 最後にケン化するのが一般的である。しかし、アミノエタンスルホン酸などの場合、この方法では合成するのが困難である。

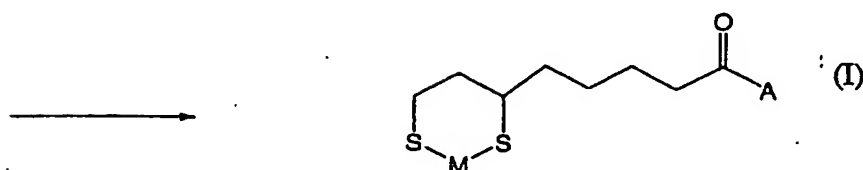
本化合物は、例えば次の合成法により、またはこれに準じて適宜合成することができる。



5



10



(式中の A および M は前記と同義である。)

- 15 本化合物の中間体 α -リポイルアミノ酸の効率的な製造方法について検討の結果、混合酸無水物法 (MA 法) により合成すると目的化合物の α -リポイルアミノ酸を高収率で得ることができることがわかった。すなわち、 α -リポ酸を有機溶媒 (たとえばクロロホルム、テトラヒドロフラン、アセトニトリルなど) に溶かし、これに 3 級アミン (トリエチルアミン、トリブチルアミンや N-メチルモルホリン (NMM) など) の存在下 $-15^{\circ}\text{C} \sim -5^{\circ}\text{C}$ でハロゲン化炭酸
- 20 エステル (クロル炭酸エチル、クロル炭酸ブチルなど)、イソブチルオキシカルボニルクロリド、塩化ジエチルアセチルまたは塩化トリメチルアセチルなどの混合酸無水物化試薬を反応させて α -リポ酸の混合酸無水物とする。反応時間は 1~2 分から数 10 分程度である。さらにアミノ酸を塩基 (水酸化ナトリウム、
- 25 水酸化カリウムやトリエチルアミン、トリブチルアミンなどの 3 級アミン) 存在下でアルコール、水またはそれらの混液などの溶媒に溶かしたものを加えて反応させた後、適当な溶媒、たとえば水またはアルコールから再結晶させると、高収率で α -リポイルアミノ酸を得る。

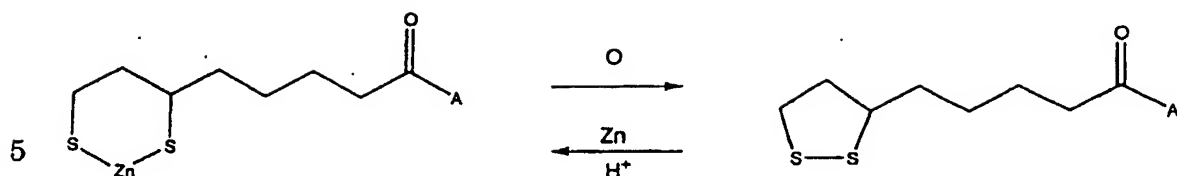
- このようにして得られた α -リポイルアミノ酸を金属と酸で還元することにより、ジハイドロ体を経て、本発明の金属キレート化合物を高収率で得ることができる。安定な α -リポイルアミノ酸を還元する際に用いられる酸としては、塩酸や硫酸などの無機酸および酢酸やクエン酸などの有機酸が挙げられる。
- 5 鉛キレート化合物の場合、分子内の2個のSH基（メルカプト基）が1原子の亜鉛と結合していると考えられる。

- 皮膚におけるメラニンの産生はメラノサイトで行われ、メラニン産生を制御する酵素として、チロシナーゼが唯一の律速酵素として長い間知られてきた。チロシナーゼを触媒するものとしてはチロシンハイドロキシラーゼ、3,4-ジヒ
- 10 ドロキシフェニルアラニン（DOPA）オキシダーゼ、5,6-ジハイドロキシインドール（DHI）オキシダーゼの3つがあり、メラニン産生の初期および後期の反応において重要な役割を果たす。後記の試験例から明らかなように、本化合物は、チロシンハイドロキシラーゼを阻害することにより、律速酵素であるチロシナーゼを阻害しメラニンの産生を抑制する。
- 15 一方、エラスターゼは皮膚などの伸展性に富んだ組織にみられる構造タンパク質であり、ペプチド間に架橋が多く弾性に富むエラスチンの分解酵素である。従って、皮膚のエラスターゼを阻害することにより皮膚などの伸展性、弾力を維持できるので、シワの予防、美肌の維持に有用である。後記の試験例から明らかなように、本化合物はエラスターゼ阻害活性も有する。
- 20 このように、本化合物はメラニン産生抑制作用とエラスターゼ阻害作用を有するという特長がある。

したがって、本化合物は皮膚のしみ、そばかす、日焼けの予防・治療剤、美白剤、美肌剤および抗シワ剤として有用である。

- また、本化合物は抗酸化作用およびラジカル抑制作用（1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドロラジカル（DPPH）の安定ラジカルを消去する）を示す。
- 25 本化合物にこのような作用があることは、たとえばヨウ素（ I_2 ）1モルを還元脱色させるために本化合物は1モル必要であり、これは理論値に一致し、本化合物は酸化されて元の α -リポイルアミノ酸となることからわかる（下記の式

参照)。



(式中の A は前記と同義である。)

- 本化合物は哺乳動物（たとえば、ウシ、ウマ、ウサギ、マウス、ラット、ヒトなど）の酸化ストレスによる種々の疾患、たとえば虚血性心疾患、脳虚血、
10 動脈硬化症、糖尿病、白内障などの予防・治療に有用である。

本化合物を医薬として用いる場合、目的と必要に応じて、本化合物のうち 1 種または 2 種以上を適宜組み合わせて含有させることもできる。

- 本化合物は上記のような疾患の治療のための医薬として経口的にあるいは非経口的に適宜に使用される。製剤の形態としては、たとえば錠剤、顆粒剤、散剤、
15 カプセル剤等の固形製剤または注射剤や点眼剤等の液剤などいずれの形にも公知の方法により調製することができる。これらの製剤には通常用いられる賦形剤、結合剤、増粘剤、分散剤、再吸収促進剤、緩衝剤、界面活性剤、溶解補助剤、保存剤、乳化剤、等張化剤、安定化剤、pH調整剤等の各種添加剤を適宜使用してもよい。

- 20 本化合物を医薬として使用する際の投与量は、使用する本化合物の種類、患者の体重や年齢、対象とする疾患の種類やその状態および投与方法などによっても異なるが、虚血性心疾患、脳虚血、動脈硬化症または糖尿病に適応する場合は、たとえば注射剤の成人への投与量は 1 日 1 回約 1mg～約 30mg 程度、内服剤の成人への投与量は、1 日数回、1 回量約 1mg～約 100mg 程度である。また、抗白内障剤
25 として用いる場合、1 日数回、1 回数滴、濃度が約 0.01～5(w/v)% の点眼剤を成人に投与するのがよい。

本化合物を含有する医薬には、本発明の目的に反しない限り、その他の同種または別種の薬効成分を適宜含有させてもよい。

本化合物は皮膚のしみ、そばかす、日焼けの予防・治療、美白、美肌または抗シワを目的として、クリーム剤、パック剤、パウダー、ローション剤や化粧水などに適宜配合することができる。また、本化合物を化粧品に配合させるときは、通常化粧品に用いられる成分、たとえば賦形剤、安定化剤、顔料、香料、
5 紫外線吸収剤、酸化防止剤、防腐剤、金属封鎖剤、有機酸などを適宜配合してもよい。

本化合物を化粧品として用いる場合は、その化合物の種類、配合しようとする化粧品の種類や配合目的などによっても異なるが、通常約 0.001~5(w/w)%, 好ましくは約 0.005~2(w/w)%程度配合するのがよい。

10 実施例

次に、参考例、実施例および試験例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されない。

参考例 1 N- α -リポイルアミノエタンスルホン酸ナトリウム

DL- α -リポ酸 6.2g をクロロホルム 60ml に溶かし、トリエチルアミン 3.2g
15 を加えて-5℃に冷却して置き、これにクロル炭酸エチル 3.3g を徐々に滴下し、滴下終了 15 分後にこれにアミノエタンスルホン酸 4.5g および水酸化ナトリウム 1.5g をメタノール 60ml に溶かしたものを一挙に加えて、その温度で 15 分間、さらに室温に戻して 1 時間攪拌させた。次に、これに水酸化ナトリウム 1.5g をメタノール 50ml に溶かした溶液を加えて、減圧下で溶媒を 1/3 になるまで
20 濃縮させ、これにエタノール 60ml を加えて析出した結晶を濾取した。これを水-メタノールから再結晶させて、目的化合物のナトリウム塩の白色結晶 5.8g を得た。融点 235~237℃。TLC、 $R_f=0.53$ (n-ブタノール：酢酸：水=4:1:2)
元素分析： $C_{10}H_{17}NO_4S_3Na \cdot H_2O$ として

理論値： C, 34.08 H, 5.43 N, 3.97

25 実測値： C, 34.23 H, 5.54 N, 3.80

参考例 2 N- α -リポイルアミノエタンスルホン酸カリウム

参考例 1 の水酸化ナトリウムを水酸化カリウム 4.0g に代えて参考例 1 と同様に反応処理してこれを水/メタノールから再結晶させて、目的化合物のカリウ

ム塩の白色結晶 6.5g を得た。融点 240~242℃。

参考例 3 N- α -リポイルアミノエタンスルホン酸カルシウムおよびマグネシウム

- 参考例 1 で得られたナトリウム塩を水に溶かし、スルホン酸樹脂で脱塩して
- 5 遊離酸として、これらに炭酸カルシウムまたは塩基性炭酸マグネシウムで、それぞれ中和させて、それぞれ水溶性のカルシウム塩またはマグネシウム塩を得た。それぞれ融点 300℃以上。

参考例 4 N- α -リポイル-6-アミノヘキサン酸ナトリウム

- DL- α -リポ酸 4.2g および 6-アミノヘキサン酸 3.0g を用いて、参考例 1 と
- 10 同様に反応させエタノールから再結晶させて、目的化合物の黄色がかった白色結晶 3.0g を得た。融点 200~202℃ (分解)。TLC, Rf=0.84 (クロロホルム:メタノール:水=5:4:1)

参考例 5 N- α -リポイルアスパラギン酸ジナトリウム

- DL- α -リポ酸 4.2g および L-アスパラギン酸 2.9g を用いて、参考例 1 と
- 15 同様に反応処理して、水/メタノールから再結晶させて、目的化合物の白色結晶 4.5g を得た。融点 300℃以上。TLC, Rf=0.47 (クロロホルム:メタノール:水=4:1:2)

参考例 6 N- α -リポイル- γ -アミノ-n-酪酸ナトリウム

- DL- α -リポ酸 4.2g および γ -アミノ-n-酪酸 2.3g を用いて、参考例 1
- 20 と同様に反応処理して、エタノールから再結晶させて、目的化合物のナトリウム塩 4.0g を得た。融点 235℃付近から徐々に分解。TLC, Rf=0.76 (クロロホルム:メタノール:水=4:1:2)

参考例 7 N- α -リポイルグリシンナトリウム

- DL- α -リポ酸 4.2g およびグリシン 1.9g を用いて、参考例 1 と同様に反応
- 25 処理して、メタノール/エタノールから再結晶させて、目的化合物の淡黄色結晶 4.5g を得た。融点 218~220℃ (分解)。TLC, Rf=0.64 (クロロホルム:メタノール:水=4:1:2)

参考例 8 N- α -リポイルフェニルアラニン

DL- α -リボ酸 4.2g および L-フェニルアラニン 3.5g を用いて、参考例 1 と同様に反応させ、溶媒を留去させた後、塩酸酸性として酢酸エチルで抽出し、水洗後、酢酸エチルを留去させた。残渣結晶をエタノール/イソプロピルエーテルから再結晶させて、淡黄色結晶 5.4g を得た。融点 154℃～156℃。TLC、

- 5 Rf=0.86 (n-ブタノール：酢酸：水=4:1:2)。

参考例 9 N- α -リポイルアントラニル酸ナトリウム

DL- α -リボ酸 4.2g およびアントラニル酸 2.9g を用いて、参考例 1 と同様にして白色結晶 3.6g を得た。融点 300℃以上。TLC、Rf=0.89 (n-ブタノール：酢酸：水=4:1:2)。

- 10 参考例 10 N- α -リポイルメチオニン

DL- α -リボ酸 4.2g および L-メチオニン 3.5g を用いて、参考例 8 と同様にして淡黄色結晶 4.0g を得た。融点 108℃～109℃。TLC、Rf=0.81 (n-ブタノール：酢酸：水=4:1:2)。

参考例 11 N- α -リポイルシステインナトリウム

- 15 DL- α -リボ酸 4.2g およびトリエチルアミン 2.2g をテトラヒドロフラン 60ml に溶かして-5℃に冷却して置き、攪拌下、これにクロル炭酸エチル 2.3g を徐々に滴下し、滴下終了後、さらに 6 分後に L-システイン 2.6g およびトリエチルアミン 2.5g を水 20ml に溶かした溶液を加えて、参考例 1 と同様に反応させた後、塩酸酸性として酢酸エチルで抽出し水洗後、酢酸エチルを留去させ
- 20 残渣をエタノールに溶かし、これに水酸化ナトリウム/メタノール溶液を徐々に加えて pH7 として析出する白色結晶 4.3g を得た。融点 150℃付近から徐々に分解。TLC、Rf=0.72 (n-ブタノール：酢酸：水=4:1:2)。また、N-エチルマレイン酸イミドを添加したものは Rf=0.69 を示した。

参考例 12 N- α -リポイル-5-ヒドロキシトリプトファン

- 25 DL- α -リボ酸 4.2g および L-5-ヒドロキシトリプトファン 5.0g を用いて、参考例 8 と同様にして白色結晶 6.4g を得た。融点 118℃～120℃。TLC、Rf=0.85 (n-ブタノール：酢酸：水=4:1:2)。

実施例 1 N-(6, 8-ジメルカプトオクタノイル) アミノエタンスルホン酸

ナトリウム亜鉛キレート化合物

- 参考例 1 で得られた化合物のナトリウム塩 5.0g を水 100ml に溶かし、これに酢酸 10ml および亜鉛末 1.3g を加えて 50℃、1 時間攪拌後、未反応の亜鉛を濾別し、濾液を減圧下で濃縮して、これにエタノールを加えて析出する白色結晶を濾取した後、さらにこれを水に溶かし、炭酸水素ナトリウムで約 pH8 として濃縮し、メタノールを加えて析出する白色結晶を濾取し、これを水/メタノールから再結晶させると、目的化合物 4.3g を得た。融点 293℃ 付近から分解。

TLC、 $R_f=0.51$ (n-ブタノール：酢酸：水=4:1:2)

元素分析： $C_{10}H_{17}NO_4S_3NaZn \cdot H_2O$ として

- 10 理論値： C, 28.75 H, 4.58 N, 3.35

実測値： C, 28.56 H, 4.69 N, 3.13

実施例 2 N- (6, 8-ジメルカプトオクタノイル) アミノエタンスルホン酸カリウム亜鉛キレート化合物

- 15 参考例 2 で得られた化合物 6.5g を実施例 1 と同様に反応処理して目的化合物 5.0g を得た。

元素分析： $C_{10}H_{17}NO_4S_3KZn \cdot 1/2H_2O$ として

理論値： C, 28.27 H, 4.27 N, 3.30

実測値： C, 28.38 H, 4.52 N, 3.10

- 20 実施例 3 N- (6, 8-ジメルカプトオクタノイル) グリシンナトリウム亜鉛キレート化合物

参考例 7 で得られた化合物 4.5g を実施例 1 と同様に反応処理して、目的化合物 3.9g を得た。融点 297℃ 付近から分解。TLC、 $R_f=0.64$ (クロロホルム：メタノール：水=4:1:2)

元素分析： $C_{10}H_{16}NO_3S_2NaZn \cdot H_2O$ として

- 25 理論値： C, 32.57 H, 4.92 N, 3.80

実測値： C, 32.43 H, 4.83 N, 3.74

実施例 4 N- (6, 8-ジメルカプトオクタノイル) アスパラギン酸ナトリウム亜鉛キレート化合物

参考例 5 で得られた化合物 3.0g を用いて、実施例 1 と同様に還元し、析出した白色結晶を濾取し、これを水にサスペンドしておき、水酸化ナトリウムで pH7~8 として溶解させ、不溶物を濾別後、濾液を濃縮し、さらにメタノールを加えて析出する白色結晶を濾取して、目的化合物 2.3g を得た。融点 295℃ 付近から分解。TLC, Rf=0.53 (クロロホルム：メタノール：水=5:4:1)

- 5 近から分解。TLC, Rf=0.53 (クロロホルム：メタノール：水=5:4:1)

元素分析： $C_{12}H_{17}NO_5S_2NaZn \cdot H_2O$ として

理論値： C, 32.11 H, 4.29 N, 3.12

実測値： C, 32.09 H, 4.44 N, 3.10

実施例 5 N- (6, 8-ジメルカプトオクタノイル) -6-アミノヘキサン酸

- 10 ナトリウム亜鉛キレート化合物

参考例 4 で得られた化合物 3.0g を 50% のテトラヒドロフラン 70ml に溶かし、実施例 1 と同様に還元し、溶媒を留去し析出した白色結晶を濾取する。

融点 215~217℃。これを水にサスペンドしておき、水酸化ナトリウムで pH7~8 として溶解させ、溶液を濃縮し、さらにメタノールを加えて析出する白色

- 15 結晶を濾取して、目的化合物 2.0g を得た。融点 295℃ 付近から分解。TLC, Rf=0.84 (クロロホルム：メタノール：水=5:4:1)

元素分析： $C_{14}H_{24}NO_3S_2NaZn \cdot H_2O$ として

理論値： C, 39.58 H, 6.17 N, 3.30

実測値： C, 39.38 H, 6.02 N, 3.13

- 20 実施例 6 N- (6, 8-ジメルカプトオクタノイル) - γ -アミノ-n-酪酸
ナトリウム亜鉛キレート化合物

参考例 6 で得られた化合物 4.0g を、実施例 1 と同様に還元、処理して、目的化合物の白色結晶 2.1g を得た。融点 297℃ から分解。TLC, Rf=0.70 (クロロホルム：メタノール：水=5:4:1)

- 25 元素分析： $C_{12}H_{20}NO_3S_2NaZn \cdot H_2O$ として

理論値： C, 36.32 H, 5.59 N, 3.53

実測値： C, 36.08 H, 5.81 N, 3.29

実施例 7 N- (6, 8-ジメルカプトオクタノイル) フェニルアラニンナトリ

ウム亜鉛キレート化合物

参考例 8 で得られた化合物 5.4g に 30%メタノール 80ml、亜鉛末 2.0g、酢酸 10ml および 2N-塩酸 20ml を加えて、50℃、3 時間攪拌後、未反応の亜鉛を濾別した後、濾液を濃縮し、水を加えて析出する油状物を集めた。これをナ
5 トリウム塩にするため、メタノールに溶かし、水酸化ナトリウム/メタノールで pH7 として析出結晶を濾取して 3.9g を得た。融点 270℃ 付近から徐々に分解。
TLC, Rf=0.82 (n-ブタノール : 酢酸 : 水=4:1:2)

元素分析: $C_{17}H_{23}NO_3S_2NaZn \cdot 1/2H_2O$ として

理論値: C, 45.39 H, 5.15 N, 3.11

10 実測値: C, 45.55 H, 5.33 N, 3.23

実施例 8 N- (6, 8-ジメルカプトオクタノイル) アントラニル酸ナトリウム
亜鉛キレート化合物

参考例 9 で得られた化合物 3.6g を用いて、実施例 7 と同様にして白色結晶 2.
1 g を得た。融点 290℃ 付近から分解。TLC, Rf=0.88 (n-ブタノール : 酢酸 :
15 水=4:1:2)

元素分析: $C_{15}H_{18}NO_3S_2 \cdot 2NaZn \cdot H_2O$ として

理論値: C, 41.81 H, 4.68 N, 3.25

実測値: C, 41.98 H, 4.64 N, 3.26

20 実施例 9 N- (6, 8-ジメルカプトオクタノイル) メチオニン亜鉛キレート化
合物

参考例 10 で得られた化合物 4.0g を用いて、実施例 7 と同様にして遊離酸の
目的化合物 2.8g を得た。融点 260℃ 付近から徐々に分解。TLC, Rf=0.82 (n-
ブタノール : 酢酸 : 水=4:1:2)

元素分析: $C_{13}H_{23}NO_3S_3Zn \cdot 1.5H_2O$ として

25 理論値: C, 36.32 H, 6.10 N, 3.26

実測値: C, 36.17 H, 5.78 N, 3.34

実施例 10 N- (6, 8-ジメルカプトオクタノイル) システイン亜鉛キレート
化合物

- 参考例 11 で得られた化合物 5.7g に 50%メタノール 100ml、亜鉛末 3.5g、酢酸 10ml および 2 N-塩酸 40ml を加えて、50℃、3 時間攪拌した後、未反応の亜鉛を濾別し、濾液を約 1/2 まで濃縮し、これに 2N-水酸化ナトリウムで pH3~4 として析出する白色結晶を濾取し、3%酢酸および水で洗った。これに 1%水酸化ナトリウム液に溶かし、酢酸酸性として析出する結晶を濾取し、水およびメタノールで洗って乾燥させた。融点 280℃付近から分解。TLC、(アンモニア水で中和して溶かしたもの) Rf=0.71 (クロロホルム：メタノール：水=5:4:1)

元素分析： $C_{22}H_{36}N_2O_6S_6Zn \cdot 3H_2O$ として

- 10 理論値： C, 31.79 H, 4.61 N, 3.37

実測値： C, 31.98 H, 4.77 N, 3.14

試験例 1 本化合物のチロシンヒドロキシラーゼ阻害作用

本化合物のチロシンヒドロキシラーゼ阻害作用について試験した。

(試験方法)

- 15 ラット脳由来のチロシンヒドロキシラーゼを試験に供した。

L-[3,5- 3H]チロシン (0.5 μ Ci/assay) を含む 100 μ M チロシンとチロシンヒドロキシラーゼ 1mg、0.2mM (6R) -5,6,7,8-テトラヒドロ-L-バリオプテリン、カタラーゼ 1.8mg/mL、5mM ジチオセレイトール (MES 緩衝液中、pH6.0) および試験物質を加えて 37℃、40 分間でインキュベートした。

- 20 反応は 1 M塩酸に入った 7.5%炭 (Charcoal) により停止させた。

3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA) からできた 3H_2O を液体シンチレーションにより測定した。

(試験物質)

- 25 参考例 1 の化合物、実施例 1 の化合物、 α -リボ酸 (0.1mM、1mM、最終濃度)

(試験結果)

その結果を表 1 に示す。

表 1 本化合物のチロシンヒドロキシラーゼ阻害作用

| 濃度 (%) | 0.1 mM | 1 mM |
|---------------|--------|------|
| 参考例 1 の化合物 | 11 | 10 |
| 実施例 1 の化合物 | 15 | 53 |
| α -リボ酸 | 2 | 1 |

値は抑制率 (%) を示す。

- 表 1 から明らかなように、本化合物にチロシンハイドロキシラーゼ阻害活性が認められた。これに対し、 α -リボ酸にチロシンハイドロキシラーゼ阻害活性は認められなかった。このことから、本化合物はメラニン産生を制御する酵素であるチロシナーゼを阻害することがわかった。

試験例 2 本化合物のメラニン産生抑制作用

試験方法

- 大日本製薬より購入のマウス由来 B16-F0 メラノーマ細胞株を実験に用いた。60mm のシャーレに 20 万個の細胞を播種し、糖合成阻害剤である D-Glucosamine Hydrochloride を 0.1% 加えた培地 (D-MEM*+10%FBS*) で 5 日間培養し、メラニン合成を停止させ白色化した。5 日間培養後に細胞を PBS(-)* で洗浄して D-Glucosamine Hydrochloride を除去した後、phosphodiesterase 阻害剤である Theophylline 2mM (250 倍濃縮液/蒸留水) を加えて細胞内 cAMP を増加させることによりチロシナーゼの生合成の回復を促進した。これと同時に試験物質 (250 倍濃縮液/PBS(-)) を添加した。Theophylline および試験物質添加 3 日後に細胞をトリプシンにより回収した。細胞ペレットを 1ml の PBS(-) に懸濁させ、このうち 0.1ml を細胞数計測に、残りの 0.9ml をメラニン量測定に用いた。メラニン量の測定は細胞ペレットを 5% トリクロロ酢酸、エタノール/ジエチルエーテル (3:1)、ジエチルエーテルで一回ずつ洗浄し風乾した後、2N NaOH 1ml を加えて溶解させ、420nm における吸光度を測定してメラニン量を標準品による検量線より求めた。

* (注)

D-MEW: Dulbecco's Modified EAGLE MEDIUM "Nissui" ② (ダルベッコ変法イーグル培地 "ニッスイ" ②)

- 25 FBS: Fetal Bovine Serum Certified, Origin: United States (非働化ウシ胎

児血清)

PBS(-) : Dulbecco's PBS(-)"Nissui"(ダルベッコ PBS(-) “ニッスイ”)

その結果を表2に示す。

表2 本化合物のメラニン産生抑制作用

| | メラニン量 (% of control) |
|--|-------------------------|
| Control | 100.00 |
| コウジ酸 0.1mM | 92.70 |
| コウジ酸 0.3mM | 88.04 |
| コウジ酸 1mM | 68.80 |
| コウジ酸 10mM | 18.73 |
| アルブチン 0.1mM | 97.29 |
| アルブチン 0.3mM | 88.86 |
| アルブチン 1mM | 83.02 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アミノエタンスルホン酸Na・Zn 0.03mM | 78.33 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アミノエタンスルホン酸Na・Zn 0.1mM | 30.01 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アミノエタンスルホン酸Na・Zn 0.3mM | 12.28 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)-6-アミノヘキサン酸Na・Zn 0.03mM | 64.43 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)-6-アミノヘキサン酸Na・Zn 0.1mM | 27.69 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)-6-アミノヘキサン酸Na・Zn 0.3mM | 9.85 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)- γ -アミノ-n-酪酸Na・Zn 0.03mM | 61.18 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)- γ -アミノ-n-酪酸Na・Zn 0.1mM | 29.20 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)- γ -アミノ-n-酪酸Na・Zn 0.3mM | 9.73 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)メチオニンZn 0.03mM | 63.05 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)メチオニンZn 0.1mM | 50.18 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)メチオニンZn 0.3mM | 16.41 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)フェニルアラニンNa・Zn 0.03mM | 71.43 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)フェニルアラニンNa・Zn 0.1mM | 37.78 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アントラニル酸Na・Zn 0.03mM | 72.47 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アントラニル酸Na・Zn 0.1mM | 47.64 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アントラニル酸Na・Zn 0.3mM | 16.74 |

- 5 表中、Znは亜鉛キレート、Na・Znはナトリウム塩の亜鉛キレートを示す(以下同じ)。

表2から明らかなように、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アミノエタンスルホン酸Na・Zn、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アミノヘキサン酸Na・Zn、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)- γ -アミノ-n-酪酸Na・Zn、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)メチオニンZn、

10

N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)フェニルアラニンNa・Zn、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アントラニル酸Na・Znに強いメラニン産生抑制作用が認められ、その作用は従来から美白剤として使用されているアルブチン、コウジ酸よりかなり強いことがわかった。

5 試験例3 本化合物のエラスターゼ阻害活性

試験方法

96穴のプレートを用いて行った。Suc(0me)-Ala-Ala-Pro-Val-MCA 1mM、検体 30 μ l、Tris-NaCl Buffer (25℃, pH7.5) 210 μ l および Elastase 1 unit/ml 30 μ l を加えて1分ごとに蛍光(Ex. 360/40nm Em. 460/40nm)を測定し、エラスターゼ阻害率を AMC (7-Amino-4-Methyl-Coumarin) 標準品による検量線より求めた。

その結果を表3に示す。

表3 本化合物のエラスターゼ阻害活性

| | エラスターゼ 阻害率(%) |
|--|------------------|
| Elastinal 0.03mM | 25.29 |
| Elastinal 0.1mM | 56.87 |
| Elastinal 0.3mM | 77.45 |
| Elastinal 1mM | 93.01 |
| α -リボ酸 0.03mM | -2.94 |
| α -リボ酸 0.1mM | 11.76 |
| α -リボ酸 0.3mM | 10.29 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)-6-アミノヘキサン酸Na・Zn 0.03mM | 94.74 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)- γ -アミノ-n-酪酸Na・Zn 0.03mM | 78.95 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)メチオニンZn 0.03mM | 7.41 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)メチオニンZn 0.1mM | 68.52 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)メチオニンZn 0.3mM | 88.89 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)フェニルアラニンNa・Zn 0.03mM | 83.33 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アントラニル酸Na・Zn 0.03mM | 24.07 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アントラニル酸Na・Zn 0.1mM | 48.15 |
| N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アントラニル酸Na・Zn 0.3mM | 72.22 |

表3より明らかなように、N- α -(6,8-ジメルカプトオクタノイル)-6-アミノヘキサン酸Na・Zn、N- α -(6,8-ジメルカプトオクタノイ

ル) γ -アミノ-n-酪酸Na \cdot Zn、N- α -(6,8-ジメルカプトオクタノイル)メチオニン Zn、N- α -(6,8-ジメルカプトオクタノイル)フェニルアラニンNa \cdot Zn、N- α -(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アントラニル酸Na \cdot ZnはElastinalと同等のエラスターゼ阻害活性を示した。一方、

- 5 α -リポ酸には全くエラスターゼ阻害作用は認められなかった。

本結果から本化合物は抗シワ剤として有用であることがわかった。

製剤実施例1 注射剤

| | |
|-----------|----------|
| 実施例1の化合物 | 2.0mg |
| D-マンニトール | 5.0g |
| 10 注射用蒸留水 | 全量 100ml |

以上の成分を常法により注射剤とする。

【0054】

製剤実施例2 点眼剤

| | |
|---------------|----------|
| 実施例2の化合物 | 0.5g |
| 15 塩化ナトリウム | 0.5g |
| ホウ酸 | 0.7g |
| ホウ砂 | 0.3g |
| p-オキシ安息香酸メチル | 0.026g |
| p-オキシ安息香酸プロピル | 0.014g |
| 20 滅菌精製水 | 全量 100ml |

以上の成分を常法により調製し点眼剤とする。

製剤実施例3 錠剤

| | |
|-------------|------|
| 実施例1の化合物 | 50mg |
| 乳糖 | 80mg |
| 25 馬鈴薯デンプン | 17mg |
| ポリエチレングリコール | 3mg |

以上を1錠剤分の材料として常法により錠剤に成型する。

製剤実施例4 化粧用クリーム剤

| | | |
|----|---------------------|-------|
| | 実施例 7, 8 または 9 の化合物 | 0.5g |
| | ステアリン酸 | 2.0g |
| | ステアリルアルコール | 7.0g |
| | スクワラン | 5.0g |
| 5 | オクチルデカノール | 6.0g |
| | ポリオキシエチレンセチルエーテル | 3.0g |
| | グリセリンモノステアレート | 2.0g |
| | プロピレングリコール | 5.0g |
| | p-オキシ安息香酸メチル | 0.2g |
| 10 | p-オキシ安息香酸プロピル | 0.1g |
| | 滅菌精製水 | 73.7g |

以上の成分を混和して化粧用クリーム剤とする。

産業上の利用可能性

- 15 本発明の金属キレート化合物またはそれらの薬理学的に許容できる塩はチロシナーゼ阻害作用、メラニン産生抑制作用およびエラスターゼ阻害作用を有しているため、皮膚のしみ、そばかす、日焼けの予防・治療薬、美白剤、美肌剤および抗シワ剤などとして有用である。

- 20 さらに、本発明の金属キレート化合物は酸化ストレスによる種々の疾患、たとえば虚血性心疾患、脳虚血、動脈硬化症、糖尿病、白内障などの予防・治療にも有用である。

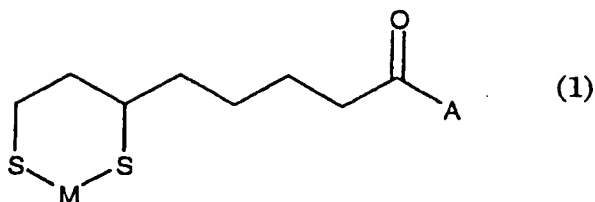
- 25 以上、本発明の態様のいくつかを詳細に説明したが、当業者であれば示された特定の態様には、本発明の新規な教示と利点から実質的に逸脱しない範囲で色々な修正と変更をなし得ることは可能であるため、そのような修正および変更も、全て後記の特許請求の範囲で定義される本発明の精神と範囲内に含まれるものである。

本出願は日本で出願された特願 2001-078571 を基礎としており、

その内容は本願明細書に全て包含するものとする。

請求の範囲

1. 次の式 (I)



(式中、Mは金属を示し、AはN結合したアミノ酸残基を示す。)で表されるN-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アミノ酸金属キレート化合物またはその薬理学的に許容できる塩。

- 10 2. N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アミノ酸金属キレート化合物がN-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)- α -アミノ酸金属キレート、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)- β -アミノ酸金属キレート、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)- γ -アミノ酸金属キレート、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)- δ -アミノ酸金属キレートおよびN-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)- ϵ -アミノ酸金属キレートからなる群から選ば
- 15 れるものである、請求項1記載のN-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アミノ酸金属キレート化合物またはその薬理学的に許容できる塩。

3. N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アミノ酸金属キレート化合物がN-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アミノエタンスルホン酸金属キレ
- 20 ト、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)グリシン金属キレート、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アスパラギン酸金属キレート、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)-6-アミノヘキサン酸金属キレート、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)- γ -アミノ-n-酪酸金属キレート、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)フェニルアラニン金属キレート、N-(6,
- 25 8-ジメルカプトオクタノイル)アントラニル酸金属キレート、N-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)メチオニン金属キレートおよびN-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)システイン金属キレートからなる群から選ばれるものである、請求項1記載のN-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アミノ酸金

属キレート化合物またはその薬理学的に許容できる塩。

4. 金属が亜鉛である請求項1記載のN-(6,8-ジメルカプトオクタノイル)アミノ酸金属キレート化合物またはその薬理学的に許容できる塩。

5. 請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる

5 塩を含有する医薬。

6. 請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩を含有するチロシナーゼ阻害剤。

7. 請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩を含有するメラニン産生抑制剤。

10 8. 請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩を含有する皮膚のしみ、そばかすまたは日焼けの予防・治療剤。

9. 請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩を含有する美白剤。

15 10. 請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩を含有する美肌剤。

11. 請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩を含有するエラスターゼ阻害剤。

12. 請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩を含有する抗シワ剤。

20 13. 請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩を含有する化粧品。

14. 請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の有効量をヒトに投与することを含む、チロシナーゼを阻害する方法。

25 15. 請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の有効量をヒトに投与することを含む、メラニン産生を抑制する方法。

16. 請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の有効量をヒトに投与することを含む、皮膚のしみ、そばかすまたは日焼けの予防・治療方法。

17. 請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の有効量をヒトに投与することを含む、皮膚の美白方法。
18. 請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の有効量をヒトに投与することを含む、皮膚の美肌方法。
- 5 19. 請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の有効量をヒトに投与することを含む、エラスターゼを阻害する方法。
20. 請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の有効量をヒトに投与することを含む、シワの予防・治療方法。
21. 医薬製造のための請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の使用。
- 10 22. チロシナーゼ阻害剤の製造のための請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の使用。
23. メラニン産生抑制剤の製造のための請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の使用。
- 15 24. 皮膚のしみ、そばかすまたは日焼けの予防・治療剤の製造のための請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の使用。
- 25 25. 美白剤の製造のための請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の使用。
26. 美肌剤の製造のための請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の使用。
- 20 27. エラスターゼ阻害剤の製造のための請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の使用。
28. 抗シワ剤の製造のための請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の使用。
- 25 29. 化粧品製造のための請求項1～4のいずれかに記載の化合物またはその薬理学的に許容できる塩の使用。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02577

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07C323/60, A61K7/00, 7/42, 31/185, 31/196, 31/197, 31/198, A61P17/16, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07C323/60, A61K7/00, 7/42, 31/185, 31/196, 31/197, 31/198, A61P17/16, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA, REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | WO 00/20385 A1 (Sankyo CO., Ltd.), 20 June, 2000 (20.06.00), Full text & JP 2000-169443 A | 1-13, 21-29 |
| A | JP 63-8316 A (Saisei Seiyaku Kabushiki Kaisha), 14 January, 1988 (14.01.88), Full text (Family: none) | 1-13, 21-29 |
| A | JUN OIZUMI, KOU HAYAKAWA, "Lipoamidase is a Multiple Hydrolase", Biochemical Journal, 1990, Vol.271, No.1, pages 45 to 49 | 1-13, 21-29 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

| | |
|---|--|
| Date of the actual completion of the international search 06 June, 2002 (06.06.02) | Date of mailing of the international search report 25 June, 2002 (25.06.02) |
|---|--|

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02577

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | WO 95/08564 A1 (Institut Europeen De Biologie Cellulaire), 30 March 1995 (30.03.95), Full text & EP 669938 A1 & US 5830994 A & JP 8-503963 A | 1-13, 21-29 |
| A | WO 00/32235 A1 (Pentapharm AG.), 08 June, 2000 (08.06.00), Full text & EP 1133317 A1 | 1-13, 21-29 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02577

Continuation of Box No.I-1 of continuation of first sheet(1)

to search.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02577

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 14-20

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 14 to 20 fall under the category of methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT,

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. 7 C07C323/60, A61K7/00, 7/42, 31/185, 31/196, 31/197, 31/198, A61P17/16, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. 7 C07C323/60, A61K7/00, 7/42, 31/185, 31/196, 31/197, 31/198, A61P17/16, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA, REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| A | WO 00/20385 A1 (SANKYO COMPANY, LIMITED) 2000.06.20, 全文 & JP 2000-169443 A | 1-13, 21-29 |
| A | JP 63-8316 A (三省製薬株式会社) 1988.01.14, 全文 (ファミリーなし) | 1-13, 21-29 |
| A | JUN OIZUMI, KOU HAYAKAWA, "Lipoamidase is a Multiple Hydrolase", Biochemical Journal, 1990, Vol. 271, No. 1, p. 45-49 | 1-13, 21-29 |
| A | WO 95/08564 A1 (INSTITUT EUROPEEN DE BIOLOGIE | 1-13, 21-29 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.06.02

国際調査報告の発送日

25.06.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J.P.)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉住 和之



4H

9165

電話番号

03-3581-1101 内線 6802

| C (続き) 関連すると認められる文献 | | |
|---------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | CELLULAIRE) 1995. 03. 30, 全文 & EP 66993 8 A1 & US 5830994 A & JP 8-503 963 A | |
| | WO 00/32235 A1 (PENTAPHARM AG) 2000. 0 6. 08, 全文 & EP 1133317 A1 | 1-13, 21-29 |

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 14-20 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 14-20 は、治療による人体の処置方法に該当し、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.